



## 超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷的工艺研究

张黎明<sup>1</sup>, 宋京涛<sup>1</sup>, 代永刚<sup>2</sup>, 杨鑫<sup>1</sup>

(1.天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2.吉林省农业科学院农产品加工研究中心, 长春 130100)

**摘要:** 以胡芦巴甾体皂苷的得率为指标,研究了超声辅助提取胡芦巴种子甾体皂苷的工艺.在考察单因素对提取得率影响的基础上设计正交实验,优化提取胡芦巴甾体皂苷的最佳工艺条件.结果表明:影响超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷因素的次序为:乙醇体积分数>料液比(g:mL)>超声时间>超声功率;其最佳提取工艺参数为:乙醇体积分数 50%,料液比 1:20,超声时间 40 min,超声功率 60 W.此时,皂苷得率为 3.07%.

**关键词:** 胡芦巴; 甾体皂苷; 超声辅助提取

中图分类号: O629.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)01-0015-04

## Study on Technology of Ultrasound-Assisted Extraction of Steroid Saponins from *Trigonell afoenum-graecum* L.

ZHANG Li-ming<sup>1</sup>, SONG Jing-tao<sup>1</sup>, DAI Yong-gang<sup>2</sup>, YANG Xin<sup>1</sup>

(1.College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2.Agricultural Products Processing Center, Jilin Provincial Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130100, China)

**Abstract:** Using the yield of steroid saponins as an index, the extracting technology of steroid saponins from fenugreek seeds was studied by ultrasound-assist method. With the single factor and orthogonal tests, the technological optimum parameters for ultrasonic extraction were found. The contents of saponins from *Trigonell afoenum-graecum* L. were determined by spectrophotometry. The results show that the factors influencing extraction yield are as follows: concentration of ethanol > solid-liquid ratio > ultrasonic time > ultrasonic power. The yield of total saponins is 3.07% at the optimum conditions of 50% ethanol solution, 1:20 of solid-liquid ratio and 40 min for extraction.

**Keywords:** *Trigonell afoenum-graecum* L.; saponins; ultrasonic assisted extraction

胡芦巴(*Trigonell afoenum-graecum* L.)种子味苦、性温,具有温肾、祛寒、止痛之功效<sup>[1]</sup>,药理作用广泛.用富含胡芦巴甾体皂苷的提取物喂饲四氧嘧啶诱导的糖尿病狗<sup>[2-3]</sup>,结果测出其粪便中含有薯蓣皂苷元、菝葜皂苷元和吉托皂苷元,其中 57%的皂苷在消化道内被水解成为皂苷元,说明胡芦巴种子中的甾体皂苷单独或与皂苷元一起发挥降低糖尿病狗血清总胆固醇的作用.因此,以胡芦巴种子为原料分离甾体皂苷作为药用食物的功能性成分,具有开发利用价值.

超声技术已经广泛应用于中草药有效成分的提

取<sup>[4]</sup>,与传统冷浸法、回流法相比,该方法能大幅度缩短提取时间、降低溶剂消耗、提高有效成分的得率.有关超声辅助提取胡芦巴皂苷的研究尚未见报道.本文将超声辅助提取法用于胡芦巴甾体皂苷的提取工艺研究,并对该工艺进行了优化.

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

胡芦巴(天津药业集团有限公司),在提取甾体皂苷之前粉碎过 40 目筛,置于索氏萃取器中,用石油醚(沸程 60~90℃)作溶剂提取 8 h 脱脂,回收石油醚

收稿日期: 2008-07-01; 修回日期: 2008-09-09

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划(08JCZDJC15300)

作者简介: 张黎明(1963—),男,山西清徐人,副教授.

得胡芦巴油及脱脂胡芦巴豆粉;标准甾体皂苷元,天津药典标准仪器药品开发公司. KQ3200DE 型超声波清洗器(40 kHz),昆山市超声仪器有限公司.

### 1.2 甾体皂苷元标准曲线的绘制

参考文献[5],以质量浓度  $X(\text{mg/mL})$  对吸光度  $Y$  进行线性回归,得回归方程  $Y=0.04507X-0.00344$ ,  $r=0.9998$ . 甾体皂苷元质量浓度在  $3.0 \times 10^{-3} \sim 2.7 \times 10^{-2} \text{ mg/mL}$  范围内成线性关系.

### 1.3 甾体皂苷得率的测定

胡芦巴甾体皂苷的含量以皂苷元含量计. 皂苷元的测定方法如下:精确移取 50 mL 总皂苷浓缩液,加入浓盐酸使混合液中 HCl 浓度达到 2 mol/L,再加入石油醚 100 mL,加热回流 5 h. 倾出、冷却、分层,取上层(石油醚相),先用碳酸钠溶液洗至中性,然后用蒸馏水洗,以新鲜石油醚为溶剂定容到 250 mL 容量瓶. 精确移取 1.00 mL 该石油醚溶液定容到 100 mL 容量瓶后,准确量取 1.00 mL 石油醚溶液,采用甾体绘制皂苷元标准曲线的方法测定吸光度,计算皂苷元质量和甾体皂苷得率.

$$\text{甾体皂苷得率} = \frac{\text{皂苷元的质量}}{\text{胡芦巴粗粉的质量}} \times 100\%$$

### 1.4 单因素实验

影响超声辅助提取的主要因素有料液比、超声作用时间、溶剂浓度和超声功率. 准确称取 10.00 g 胡芦巴粗粉,按以上 4 个因素的不同设定条件进行超声辅助提取,酸水解后得到甾体皂苷元提取物,采用分光光度法测定产品中皂苷元质量.

### 1.5 正交实验

在单因素实验的基础上,采用  $L_9(3^4)$  正交实验对超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷的条件进行优化.

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验结果

#### 2.1.1 料液比对胡芦巴甾体皂苷提取得率的影响

在超声时间 30 min,乙醇体积分数 50%,超声功率 70 W 的条件下,料液比对胡芦巴甾体皂苷提取得率的影响如图 1 所示. 由图 1 可知,当料液比(g:mL)为 1:5 时,甾体皂苷得率偏低,随着加入溶剂的体积增大,甾体皂苷得率也逐渐增加,直到加入的料液比为 1:20 时,甾体皂苷得率达到最大. 随着加入溶剂体积的继续增加,甾体皂苷得率有所降低,由此可说明,溶剂的体积过大使一些杂质溶出,影响甾体皂苷得率.

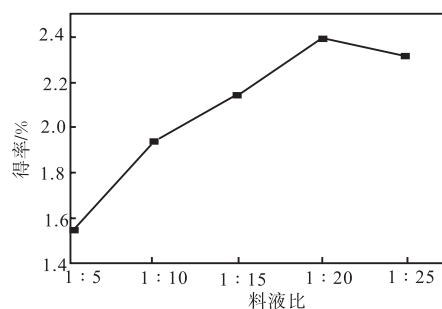


图 1 料液比对甾体皂苷提取得率的影响

Fig.1 Effects of solid-liquid ratio on the yield of total saponins

#### 2.1.2 超声时间对胡芦巴甾体皂苷提取得率的影响

超声时间对甾体皂苷提取得率的影响见图 2. 由图 2 可知,当超声时间从 10 min 延长到 40 min 时,甾体皂苷得率迅速提高;随着超声时间的继续延长,甾体皂苷得率增长趋于平缓. 这主要是因为:随着提取时间的延长,皂苷基本被提取完全.

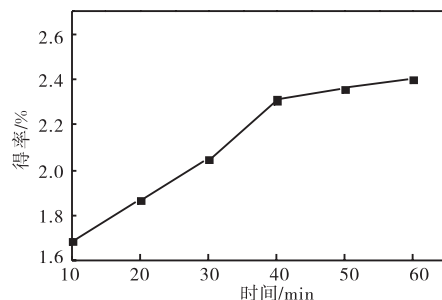


图 2 超声时间对甾体皂苷提取得率的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic time on the yield of total saponins

#### 2.1.3 乙醇含量对胡芦巴甾体皂苷提取得率的影响

乙醇含量对甾体皂苷提取得率的影响见图 3. 从图 3 可见,当乙醇体积分数从 40%增大到 50%的过程中,甾体皂苷得率显著提高,当乙醇体积分数继续上升,甾体皂苷得率反而下降. 说明甾体皂苷得率随提取液中乙醇含量在一定范围内的升高而提高,超过了一定的范围,反而随乙醇体积分数的提高而下降.

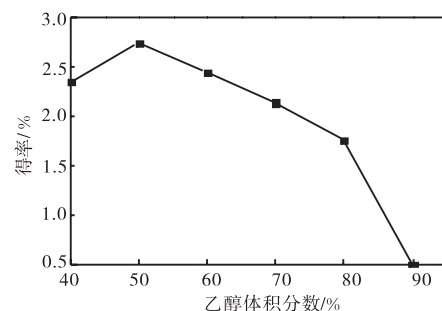


图 3 乙醇含量对甾体皂苷提取得率的影响

Fig.3 Effects of concentration of ethanol on the yield of total saponins

2.1.4 超声功率对胡芦巴甾体皂苷提取率的影响

超声功率对甾体皂苷提取率的影响见图 4. 从图 4 可看出,当超声功率从 48 W 增大到 60 W 的过程中,甾体皂苷得率显著提高,当超声功率继续上升,甾体皂苷得率反而下降. 说明甾体皂苷得率随超声功率在一定范围内的升高而提高,超过了一定的范围,反而下降.

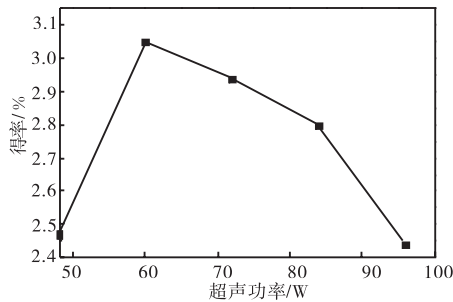


图 4 超声功率对提取甾体皂苷得率的影响

Fig.4 Effects of ultrasonic power on the yield of total saponins

2.2 正交实验及方差分析结果

为了全面考察影响因素,根据单因素实验结果,确定了  $L_9(3^4)$  正交实验的因素和水平,正交实验结果见表 1.

表 1 超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷工艺条件的正交实验结果

Tab.1 Orthogonal test and experimental results for ultrasonic assisted extraction of steroid saponins

实验号	(A) 料液比	(B) 超声 时间/min	(C) 乙醇体积 分数/%	(D) 超声 功率/W	得率/%
1	1:15	20	40	48	2.25
2	1:15	40	50	60	2.60
3	1:15	60	60	72	2.28
4	1:20	20	50	72	2.73
5	1:20	40	60	48	2.52
6	1:20	60	40	60	2.65
7	1:25	20	60	60	2.36
8	1:25	40	40	72	2.53
9	1:25	60	50	48	2.69
$k_1$	2.38	2.45	2.48	2.48	
$k_2$	2.63	2.55	2.68	2.54	
$k_3$	2.53	2.54	2.39	2.51	
极差	0.26	0.10	0.29	0.05	

通过因素级差分析可以得出超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷的最佳工艺条件为  $A_2B_2C_2D_2$ , 即料液比 1:20, 超声时间 40 min, 乙醇体积分数 50%, 超声功率 60 W. 通过验证, 此时的甾体皂苷得率为 3.07%.

正交实验的方差分析结果见表 2. 影响甾体皂苷提取效果诸因素的主次关系依次是: 乙醇体积分数 > 料液比 > 超声时间 > 超声功率.

表 2 方差分析表

Tab.2 Angular transformation

因素	离差平方和	自由度	均方离差	F 值	显著性
A	0.100	2	25.000	19.000	*
B	0.019	2	4.750	19.000	
C	0.129	2	32.250	19.000	**
误差	0	2			

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.000$

2.3 方法比较

实验对比了超声提取与传统提取的差别, 分别采用质量分数 70% 的乙醇为提取溶剂, 料液比 1:20 进行热回流<sup>[6]</sup>和索氏提取实验, 结果见表 3.

表 3 不同提取方法的结果对比

Tab.3 Comparison of different extraction methods

提取方法	温度/°C	提取时间/min	提取次数	得率/%
热回流	90	120	2	2.09
索氏提取	90	240	1	2.54
超声辅助提取	30	40	1	3.07

通过比较可见, 超声辅助提取胡芦巴甾体皂苷得率为乙醇热回流得率的 1.41 倍, 是索氏得率的 1.21 倍, 而前两种提取方法所用的提取时间却是超声时间的 6 倍, 而且超声辅助提取所用的乙醇体积分数为 50%, 提取温度为 30 °C, 节约了生产成本. 因此, 超声辅助提取能显著加速植物中有效成分的提取得率.

3 结 论

以胡芦巴为原料提取的甾体皂苷, 采用超声辅助提取工艺有利于提高皂苷的得率. 超声辅助提取工艺的最佳提取条件是: 乙醇体积分数 50%, 料液比 1:20, 超声时间 40 min, 超声功率 60 W, 此时, 甾体皂苷得率为 3.07%. 与其他提取方法比较, 超声辅助提取法的得率有明显提高.

参考文献:

[1] 丁平. 一种值得研究和开发的资源植物—胡芦巴[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(2): 17-19.  
 [2] 荆宇, 赵余庆. 胡芦巴化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1146-1149.  
 [3] Pierre R P, Yves D S, Dominique M H, et al. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification,

and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol[J]. *Steroids*, 1995, 60(10): 675-680.

- [4] 曾里, 夏之宁. 超声波和微波对中药提取的促进和影响[J]. *化学研究与应用*, 2002, 14(3): 245-249.

- [5] 王俊, 杨克迪, 陈钧. 分光光度法测定甾体皂苷元[J]. *分析试验室*, 2004, 23(1): 73-75.

- [6] 张黎明, 赵玉平, 王海宽, 等. 从中药葫芦巴种子提取薯蓣皂甙元工艺的研究[J]. *天津轻工业学院学报*, 2003, 18(2): 6-8.

(上接第14页)

金属离子来源于培养基中的成分, 主要是蛋白胨、酵母粉等, 其中酵母粉的成分波动较大. 因此, 对酵母粉的成分进行分析并进行合理控制利于菌株 TCCC 28001 的生长和脲水合酶的合成.

#### 参考文献:

- [1] Ohtsuka Y, Hasegawa J, Nakatsuji H, et al. Density functional study on geometry and electronic structure of nitrile hydratase active site model [J]. *J Inter Quan Chem*, 2002, 90(3): 1174-1187.
- [2] Akimasa Miyana, Shinya Fushinobu, Kiyoshi Ito, et al. Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(7): 429-438.
- [3] Huang W, Jia J, Cummings J, et al. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold [J]. *Structure*, 1997, 5: 691-699.
- [4] Toru Nagasawa, Koji Takeuchi, Hideaki Yamada. Occurrence of cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* J1 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988(155): 1008-1016.
- [5] Toru Nagasawa, Koji Takeuchi, Vincenzo Nardi-Dei, et al. Optimum culture conditions for the production of cobalt-containing nitrile hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* J1 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 34: 783-788.
- [6] Toshifumi Yamaki, Toshihiro Oikawa, Kiyoshi Ito, et al. Cloning and sequencing of a nitrile hydratase gene from

*Pseudonocardia thermophila* JCM3095 [J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83: 474-477.

- [7] LI Wen-zhong, ZHANG Yi-qiang, YANG Hui-fang. Formation and purification of nitrile hydratase from *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ZBB-41 [J]. *Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 36: 171-181.

- [8] Ichiro Watanabe, Yoshiaki Satoh, Kanehiko Enomoto, et al. Optimal conditions for cultivation of *Rhodococcus* sp. N-774 and for conversion of acrylonitrile to acrylamide by resting cells [J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 3201-3206.

- [9] Michihiko Kobayashi, Sakayu Shimizu. Cobalt proteins [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 261: 1-9.

- [10] Nagasawa T, Namba H, Ryuno K, et al. Nitrile Hydratase of *Pseudonocardia Chlororaph* is B23-Purification and Characterization [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 162: 691-698.

- [11] Kobayashi M, Shimizu S. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology [J]. *Nature Biotechnol*, 1998, 16: 733-736.

- [12] 刘铭, 焦鹏, 曹竹安. 微生物法生产丙烯酰胺的生物催化剂-脲水合酶研究进展 [J]. *化工学报*, 2001, 10(52): 847-852.

- [13] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.

- [14] Suckling C J. *Enzyme Chemistry: impact and application* [M]. London: Chapman and Hall Press, 1984.

- [15] 蔡谦, 吴明火, 郑裕国, 等. 对羟基苯乙脲水合酶高产菌株的选育 [J]. *生物加工过程*, 2005, 3(3): 38-41.